

콧티스속 근경과 탈지된 클로톤 종자의 혼합 추출물(CP-2)이 난포 Granulosa Cell에 미치는 영향

김종배 · 홍은경 · 문정조* · 한영복* · 정길생
건국대학교 축산대학 동물자원연구센터, 실험종양연구소*

Effect of CP-2 Extracted from *Coptis* and *Croton tiglium* L. on the Growth and Steroidgenesis of Follicular Granulosa Cells

Kim, J.B, E.K. Hong, J.J. Mun*, Y.B. Han* and K.S. Chung

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

Institute of Experimental Tumor*

SUMMARY

We investigated the effects of CP-2 extracted from the mixture of *Coptis* and *Croton tiglium* L, which showed very high cytotoxic effect to the various tumor cells, on the growth and steroidgenesis of primary and transformed cell lines PA-GS6 and PO-GRS1 by cotransfection with SV40 and Ha-ras oncogenes. CP-2 inhibited the growth of PA-GS6 and PO-GRS1 in a dose dependent manner when the growth of them was measured by cell number and by protein content, while CP-2 did not affect the growth of primary granulosa cells. Productions of progesterone of primary and transformed granulosa cells were stimulated by forskolin, but this stimulatory effect was blocked by treatment of CP-2. Clinical application of CP-2 as a new anti-cancer drug and utilization of transformed granulosa cells as a model system for the screening of anti-cancer drug were also discussed.

Key words : anticancer agent, granulosa cell, progesterone, cytotoxic effect

I. 서 론

Granulosa cell은 cAMP의 영향을 받아 분화되어 여러층으로 이루어진 과립층을 형성하는 세포이다(Knecht 등, 1981). 이 세포는 뇌하수체에서 분비되는 성선 자극 호르몬의 영향으로 계속 증식하여 난포강을 형성하며 배란 후에는 황체로 변화하여 progesterone을 분비하게 되는데 progesterone은 feedback mechanism에 의해 성선 자극 호르몬 분비를 억제하여 새로운 난포의 발달을 억제할 뿐만 아니라 자궁내막을 더욱 발달시켜 수정란이 착상할 수 있도록 준비시키게 된다.

최근 Suh 등은 SV-40와 Ha-ras oncogene을 primary granulosa cell에 cotransfection시켜 progesterone 분비 능력을 가진 cancer cell line을 만들어내었다(Suh와 Amsterdam, 1990). 이 cell line은 progesterone을 생합성할 수 있는 능력이 있으므로 약물의 효과를 progesterone 합성정도로 측정하여 정량화할 수 있다는 장점을 지니고 있다.

본 연구에 사용된 약물은 본 실험실에서 개발한 과두와 황련의 혼합 추출물로부터 제조된 생약제제로서 이는 *in vivo*와 *in vitro*에서 모두 강한 항암효과와 다양한 암세포주에 대한 세포독성효과가 있음을 보고한 바 있다(김 등, 1993a, b)

분화과정에 대한 oncogene 발현 효과를 연구할 때

granulosa cell을 많이 이용하고 있는 바, 본 약제가 정상적인 granulosa cell 및 transformed cell에 미치는 영향을 조사하는 것은 상당히 흥미있는 일이라 할 수 있다. 특히 난소의 granulosa cell은 progesterone 및 20α -OH-progesterone과 같은 steroid hormone을 생합성할 수 있는 기능이 있어 본 약제가 세포에 미치는 영향을 조사하는데 좋은 지표로 활용할 수 있는 장점이 있을 뿐 아니라 본 약제의 항암효과에 대한 기전을 밝히는데 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 실험에서는 primary granulosa와 transformed granulosa cell lines(PA-GS6, PO-GRS1)을 대상으로 본 약제가 세포의 성장 및 steroidogenesis에 미치는 영향을 조사하여 흥미있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. Primary granulosa cells

25일된 미성숙 female rat에 PMSG(15IU)를 주사하거나 26일된 미성숙 female rat에 diethylstilbestrol(1.5mg /rat /day)을 3일간 주사한 후 cervical dislocation에 의해 도살하였으며 난소를 적출하여 10mM EDTA와 0.5M sucrose용액에 배양한 후 27 gage 주사바늘로 난포를 찢어 granulosa cells을 회수하였다. Cell culture는 Nunc Culture dish (100mm)에서 5% Fetal Calf Serum(FCS)을 함유하는 DMEM /F12(1:1) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 실시하였다.

2. Cell lines

Transformed cell line인 PA-GS6와 PO-GRS 1은 Israel Weizmann Institute of Science의 Prof. Amsterdam으로부터 기증받은 것을 사용하였다.

3. Cell culture

Penicillin(100 U /ml), streptomycin(100 μ g /ml) 및 5% FCS를 포함하는 DMEM /F12 medium(1:1)을 배양에 사용하고 biochemical assays를 위해서는 세포의 농도를 5.0×10^5 으로 하여 Nunc petri dishes(35mm)에 접종하고 insulin(2 g /ml),

hydrocortisone(40 μ g /ml), transferrin(5 μ g /ml), fibronectin(1.5 μ g /ml)을 포함하는 serum free medium(DMEM /F12)을 사용하여 배양하였다.

4. Phase contrast microscopy

배양된 세포(PA-GS6, PO-GRS1)에 본 약제를 처리하고 48시간 후 2.5% glutaraldehyde가 든 PBS에 고정시켜 400배의 배율로 사진 찍었다(Zeiss Photomicroscope III).

5. Progesterone 분석

약제를 처리하고 48시간 배양한 후 radioimmunoassay(RIA)로 progesterone의 양을 측정하였다(Amsterdam 등, 1989; Kohen 등, 1975).

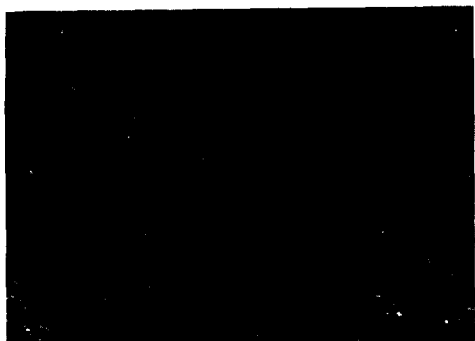
6. 파두와 황련의 혼합추출물 준비

본 연구에서 사용된 추출물(CP-2)의 준비는 전보와 같이 *Coptis chinensis* Franch의 뿌리 160g과 *Croton tiglium* L. 탈지 종자 160g을 혼합, 분쇄한 후 클로로포름 1.5 l로 36시간 동안 실온에서 교반한 다음 정치하여 클로로포름층을 제거하고 남은 잔사를 암실에서 풍건하여 용매를 제거한 후, 이 잔사를 2 l의 증류수로 70°C ~ 80°C에서 20시간 추출하고 따로 보관한 후 다시 2 l의 증류수로 재추출하여 혼합하였다. 이 추출액을 80°C에서 감압 농축한 다음, 증기압(20 psi, 120°C)에서 포화시킨 후, 생성된 침전물을 원심분리하여 제거하고 여액을 분액 깔때기에 넣고 클로로포름 500ml를 가하여 진탕한 후 수용액층을 얻은 다음 다시 증기압으로 포화시켰다. 이 때 생성된 침전물을 제거하고, 여액을 여과지로 다시 여과한 후 동결건조하여 얻은 황색분말을 5 μ g /ml, 20 μ g /ml 농도로 사용하였다.

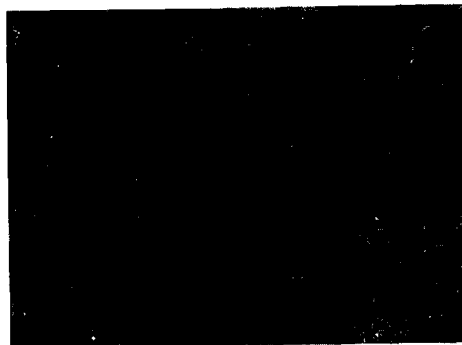
III. 결 과

1. Microscopy

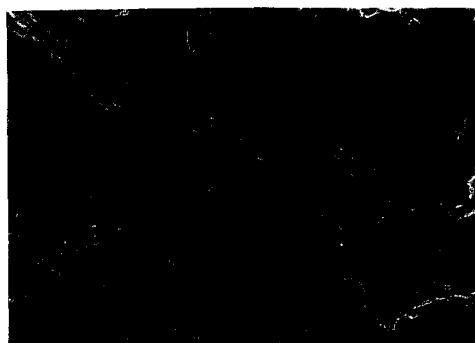
PA-GS6와 PO-GRS1에 CP-2 (50 μ g /ml, 20 μ g /ml)를 처리하고 48시간 후 대조군과 비교하였다. PO-GRS1은 preovulatory follicles의 granulosa cells을 SV40와 Ha-ras oncogene으로 cotransfection시킨 cell line으로서 Fig. 1의 (1)에서 보이는



(1)

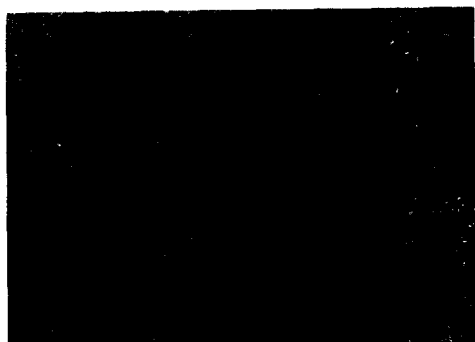


(2)

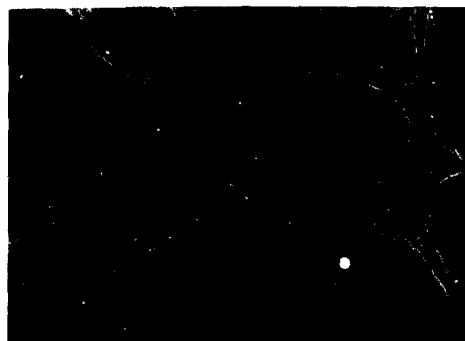


(3)

Fig. 1. Phase contrast micrograph of cotransfected rat granulosa cells from preantral follicles (PA-GS6) with (B, C) and without (A) treatment of extracted from the mixture of *Coptis* and *Croton tiglium* L. A, control : without treatment. B, with extract (5 μ g/ml) and C, with (20 μ g/ml)



(A)



(B)



(C)

Fig. 2. Phase contrast micrograph of cotransfected rat granulosa cells from preantral follicles (PO-GRS1) without (A) and with (B, C) treatment of extract. A, control : without treatment. B, with extract (5 μ g/ml) and C, with extract (20 μ g/ml)

바와 같이 세포들은 길게 늘어져 덩어리를 이루며 plastic culture dish에 밀착되어 있다. 본 약제를 처리한 것은 세포가 죽어 세포 사이의 간격이 넓어지며 drug의 양이 증가할수록 그 간격은 더 커지고 세포가 늘어진 정도도 약해졌다(Fig. 1의 2와 3).

Fig. 2에 나타난 바와 같이 PA-GS6는 preantral follicles의 granulosa cells을 SV40 DNA로 transfection시킨 cell line으로서 평평한 형태를 하며 길게 늘어지고 plastic culture dish에 단단히 밀착되어 있지만(Fig. 2의 1), 본 약제를 처리하면 세포가 죽어 세포들 사이의 간격이 넓어지는 동시에 늘어진 정도도 현저히 줄어들었으며(Fig. 2의 2), drug이 많아지면 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 세포의 debris만 남게 된다(Fig. 2의 3). PA-GS6가 PO-GRS1에 비해 약제에 대한 감수성이 더 큰 것으로 보인다.

2. Primary 및 Transformed cells의 성장에 미치는 CP-2의 영향

CP-2의 양을 달리하여(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) primary granulosa cell과 Po-GRS1, PA-GS6에 첨가하고 무 첨가구를 대조군으로 하여 48시간 배양한 후 세포의 수와 단백질의 양을 측정(Bradford, 1976)하여 Fig. 3, 4와 같은 결과를 얻었다.

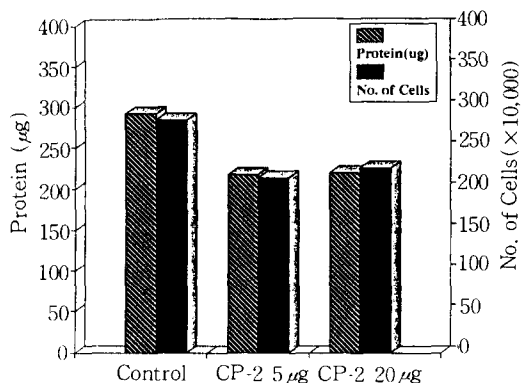
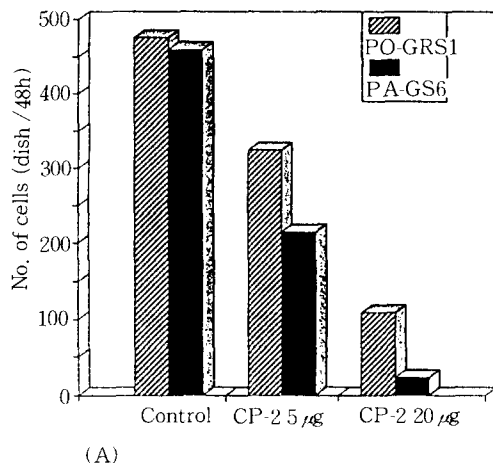


Fig. 4. Effect of CP-2 extracted from the mixture of *Croton tiglium* L. and *Coptis* on the growth of primary granulosa cells. Growth of cells were measured by cells number and by protein content in cells using the Bradford method. (Bradford 1976).

Fig. 3의 (A)에 나타난 바와 같이 PO-GRS1의 경우 세포의 수가 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가구에서는 32%가 감소하였고, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가구에서는 77% 감소하였다. PA-GS6의 경우에는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가 시 53% 감소, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가 시 95%가 감소하여 PO-GRS1에 비해

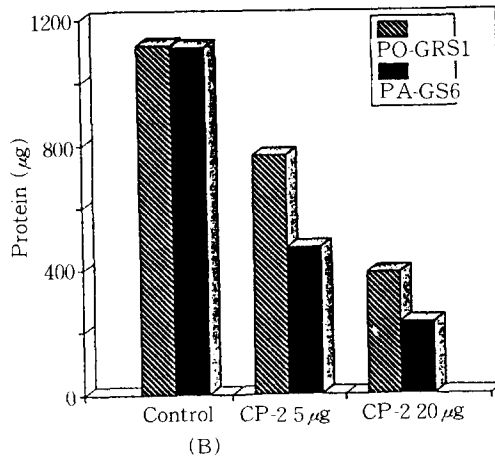


Fig. 3. Effect of CP-2 extracted from the mixture of *Croton tiglium* L. and *Coptis* on the growth of cotransfected rat granulosa cells from preantral follicles(PA-GS-6) and preovulatory follicles(PO-GRS1). Growth of cells were measured by cells number (A) and by protein content (B) in cells using the Bradford method(Bradford, 1976). Data are means of triplicate cultures (35 mm, Nunc culture plate). Cells were cultured with (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and without CP-2.

더욱 효과적이었다.

Fig. 3의 (B)는 단백질 함량을 측정함으로써 transformed cells의 성장에 미치는 본 약제의 영향을 조사한 결과로, 단백질의 양도 PO-GRS1의 경우 5 μ g/ml 첨가구에서 31.3%, 20 μ g/ml 첨가구에서는 65% 감소하였고 PA-GS6의 경우에는 5 μ g/ml 첨가구에서 57.6%, 20 μ g/ml 첨가구에서는 79.5% 감소하여 비슷한 결과를 보였다.

반면에 primary granulosa cell에서는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 cells수와 단백질 양이 5 μ g/ml와 20 μ g/ml 첨가구에서 비슷하게 20~25% 정도의 감소를 보였을 뿐, 약제의 양에 비례하여 감소되지 않았다. 이것으로 보아 본 약제가 transformed cells에서는 분명한 감소 효과를 나타내지만 정상 cells에서는 거의 독성이 없는 것으로 보인다.

3. Steroidgenesis에 미치는 CP-2의 영향

본 실험에 사용된 cell line은 모두 steroid hormone인 progesterone을 생합성할 수 있는 세포이기 때문에 본 약제가 이들 세포들의 steroid hormone 생합성에 미치는 영향을 조사하기 위해 본 약제 5 μ g/ml와 20 μ g/ml를 첨가하여 이들 세포의 progesterone과 20 α -OH-progesterone 생합성 정도를 무 첨가구와 비교 조사하였다. 아울러 granulosa cell을 자극하여 이들 두 steroid hormone의 생합성률을 증가시키는 forskolin의 영향도 대조구로써 함께 조사하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 PO-GRS1에 forskolin 첨가시 무첨가구에 비해 20 α -OH-progester-

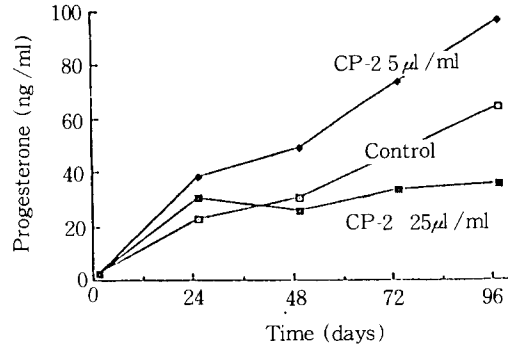


Fig. 5. Effect of CP-2 extracted from the mixture of *Croton tiglium* L. and *Coptis* on progesterone and 20 α -OH-progesterone production of primary granulosa cells. Cell seeding conc. was 5×10^5 cells (35 mm, Nunc culture plate), biochemical assay was performed after 48 hr.

one의 경우 거의 100배, progesterone의 경우에는 약 140배의 증가를 나타낸 반면, 본 약제 첨가구에서는 progesterone의 경우에만 5 μ g/ml 첨가시 1.5배, 20 μ g/ml 첨가시 3.1배 정도의 증가를 보였을 뿐 20 α -OH-progesterone에서는 증가현상을 나타내지 않았다. 이와 같은 현상은 PA-GS6에서도 거의 비슷하게 나타났다.

본 약제가 primary granulosa cell의 progesterone 생합성에 미치는 영향은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 본 약제를 20 μ g/ml 첨가했을 때 5 μ g/ml 첨가구보다 시간이 지남에 따라 오히려 progesterone 생합

Table 1. Effect of CP-2 extracted from the mixture of *Croton tiglium* L. and *Coptis* on progesterone and 20 α -OH-progesterone production of transformed cell lines. Cell seeding conc. was 5×10^5 cells (35 mm, Nunc culture plate), biochemical assay was performed after 48 hrs.

Cell lines	Treatments	Progesterone (ng/ml)	20 α -OH-prog. (ng/ml)
PO-GRS1	Control	0.393	0.625
	CP-2 5 μ g/ml	0.380	0.915
	CP-2 20 μ g/ml	0.420	0.613
	Forskolin	56.90	62.90
PA-GS6	Control	0.521	0.713
	CP-2 5 μ g/ml	0.694	0.736
	CP-2 20 μ g/ml	0.712	0.734

성 양이 감소하는 현상을 나타내어 dose-dependent 한 상관관계를 보여주지 못해 본 약제 자체가 granulosa cells의 steroidogenesis에 직접적인 영향을 미친다고 보기는 어렵다.

따라서 본 약제가 primary granulosa cell이든 transformed granulosa cell이든 forskolin과는 달리 steroidogenesis에는 크게 영향을 미치지 않았다. 그러나 한가지 흥미로운 사실은 forskolin에 의한 progesterone 증가 효과가 본 약제를 첨가하였을 시에는 나타나지 않는다는 점이다(Fig. 6). 이는 본 약제가 forskolin의 효과를 저해하는 작용이 있음을 시사하는 결과라 사료된다.

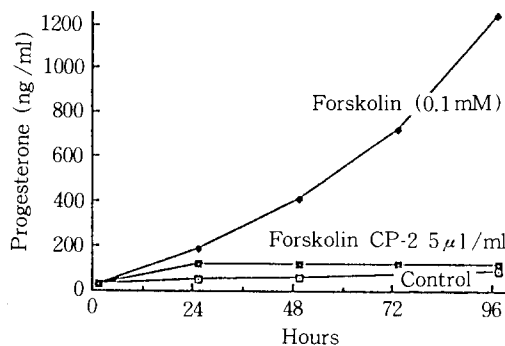


Fig. 6. Effect of CP-2 extracted from the mixture of *Croton tiglium* L. and *Coptis* on progesterone and 20 α -OH-progesterone production of primary granulosa cells. Cell seeding conc. was 5×10^6 cells (35 mm, Nunc culture plate), biochemical assay was performed after 48 hr.

IV. 고 찰

본 실험에 사용된 transformed cells은 human에 서 가장 광범위하게 존재하는 oncogenes 중의 하나인 ras oncogene과 SV40 DNA를 이용하여 변형시킨 것으로서 ras proteins은 포유동물에서 cellular proliferation과 terminal differentiation에 관여하는 것으로 알려져 있다(Dotto 등, 1985; Guerrero 등, 1986).

Granulosa cells의 progesterone합성은 gonadotropic hormone의 자극에 의해 촉진되며 이 과정의

대부분은 cAMP-dependent pathway에 의해 진행되고(Hsueh 등, 1984; Amsterdam과 Rotmensh, 1987), 다른 일부는 cAMP와는 상관없이 inositol triphosphate와 cytosolic free Ca^{2+} 에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다(Davis 등, 1987).

Primary granulosa cells에서의 steroidogenesis는 cAMP에 의해 일어나는 것으로 보고된 바 있고(Knecht 등, 1981), transformed cells에서도 cAMP가 progesterone과 20 α -OH-progesterone의 생성을 촉진하는 것으로 밝혀졌다(Suh와 Amsterdam, 1990).

Table 1과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 본 약제가 transformed cell과 primary cell공히 이들의 steroidogenesis에는 아무런 영향을 나타내지 않았다.

따라서 본 약제가 adenylate cyclase의 활성을 저해함으로써 cAMP의 생산을 저하시키고 이 결과로서 초래되는 steroidogenesis를 저하시키는 영향은 없는 것으로 판단된다. 그러나 forskolin을 첨가했을 시 adenylate cyclase를 자극하여 cAMP 생산을 증가시켜 progesterone 증가현상을 나타내는 효과가 본 약제를 첨가했을 때 보이지 않는 것은 매우 흥미로운 사실이다.

이는 본 약제가 adenylate cyclase 활성을 저해함으로써 야기되는 현상이 아니라 forskolin의 antagonist 역할을 하는 성분이 약제 내에 함유되어 있기 때문이라 사료된다. 그러나 이 현상에 대한 기전을 좀 더 구체적으로 규명하기 위해선 본 약제를 투여하였을 때 cAMP의 수준 변화도 조사해야겠지만 본 약제의 성분분석에 따른 기능조사를 함께 수행해야 할 것이다.

본 연구에서 사용된 과두와 황련의 혼합추출물이 PO-GRS1이나 PA-GS6와 같은 transformed cells에 대해서 현저한 세포독성효과를 나타낸 것은 본 약제가 갖는 암세포주에 대한 세포독성효과 때문인 것으로 사료된다.

본 약제가 단일성분이 아닌 바 본 약제의 세포독성 효과에 대한 기전을 논하기는 조심스러운 일이지만, 본 약제 내에 SV40나 ras oncogene의 발현을 저해하는 인자가 있기 때문에 나타나는 현상일 가능성은 충분히 있다고 생각된다.

어떻든 본 약제의 효과를 규명하는 데 있어서 본 약제에 대한 성분이 완전히 규명될 경우, 본 연구에서 사용된 PO-GRS1 혹은 PA-GS6는 그 이용 가치가 클

것으로 기대된다. 본 약제가 primary granulosa cell에 있어서는 뚜렷한 독성 효과를 나타내지 않았다는 점은 특기할 만한 사실이다.

Granulosa cell에 대한 조사만으로 본 약제가 정상 세포에 대한 독성효과가 거의 없다고 단정하기는 어렵지만 다양한 암세포주에 대한 세포독성효과를 갖고 있는 점(김춘원 등, 1993a)과 본 약제에 대한 장기간의 안전성 시험 결과 거의 부작용을 나타내지 않았다는 점(김춘원 등, 1993b)을 감안할 때 정상세포에 대한 효과는 매우 미약하거나 없을 것으로 추측된다.

현재 사용되고 있는 화학요법제들이 부작용이 심해 장기적인 사용이 어려운 상황에서 본 약제가 정상 cells에 대한 damage가 적고 cancer cells에 대한 cytotoxic effect는 상당히 큰 효과를 나타내었다는 사실은 본 약제의 항암제로서의 이용가능성을 제고시킬 수 있는 매우 고무적인 결과라 할 수 있겠다. 또한 분화과정에 있는 정상세포에 대한 보전효과는 본 약제가 우수한 화학요법제제가 될 수 있는 가능성을 높여 줄 수 있는 결과라 하겠다.

V. 참고문헌

1. Amsterdam, A. and S. Rotmensch. 1987. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr. Rev.* 8:309-338.
2. Amsterdam, A., S. Rotmensch, A. Furman, E.A. Venter and I. Vlodavsky. 1989. Synergistic effect of hyman chorionic gonadotropin and extracellular matrix on *in vitro* differentiation of human granulosa cells: progesterone production and gap junction formation. *Endocrinol.* 124:1956-1964.
3. Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
4. Davis, J.S., L.L. Weakland, R.V. Farese and L.A. West. 1987. Luteinizing hormone increase inositol triphosphate and cytosolic free Ca^{2+} in isolated bovine luteal cells. *J. Biol. Chem.* 262:8515-8521.
5. Dotto, G.P., L.E. Parada and R.A. Weinberg. 1985. Specific growth response of ras-transformed embryo fibroblasts to tumor promoters. *Nature* 318:472-475.
6. Guerrero, I., H. Wong, A. Pellicer and D. Burstein. 1986. Activated N-ras gene induces neuronal differentiation of pc 12 rat pheochromocytoma cells. *J. Cell Physiol.* 129:71-76.
7. Hsueh, A.J.W., E.Y. Adashi, P.B.C. Jones and T.H. Welsh Jr. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5:76-126.
8. Knecht, M., A. Amsterdam and K.J. Catt. 1981. The regulatory role of cyclic AMP in hormone-induced granulosa cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 256:10628-10633.
9. Kohen, F., S. Bauminger and H.R. Lindner. 1975. Preparation of antigenic steroid-protein conjugates. In: Cameron EHD, Hiller SG, Griffiths K(eds) *Steroid Immunoassay*. Alpha Mega Publishing Ltd, Cardiff, Wales, pp.11-23.
10. Suh, B.S. and A. Amsterdam. 1990. Establishment of highly steroidogenic granulosa cell lines by cotransfection with SV-40 and Ha-ras oncogene: Induction of steroidogenesis by cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and its suppression by phorbol ester. *Endocrinol.* 127:2489-2500.
11. 김춘원, 서경원, 조영호, 홍은경, 한영복, 문정조, 경홍기, 김정한, 김종배. 1993a. 콤텍스속 근경과 탈지된 클로톤 종자의 혼합추출물(CP-2)이 수중 암세포주에 미치는 세포독성효과. *중앙의학* 58(3) : 185-194.
12. 김춘원, 문정조, 한영복, 서경원, 조영호, 홍은경, 김종배. 1993b. 콤텍스속 근경과 탈지된 클로톤 종자의 혼합추출물(CP-2)이 동물 체내에서의 수중 암세포증식에 미치는 영향. *중앙의학* 58(4) : 인쇄중.